

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

Image available\*\*

CONTAINING PHENYL HYDROXYLASE GENE REGION, RECOMBINANT  
FORMANT AND DECOMPOSITION OF TRICHLOROETHYLENE

06-105691 [J P 6105691 A]

April 19, 1994 (19940419)

NAKAMURA KANJI

MIZUMOTO MASAHIRO

KURITA WATER IND LTD [000106] (A Japanese Company or  
Corporation), JP (Japan)

04-256857 [JP 92256857]

September 25, 1992 (19920925)

[5] C12N-015/53; A62D-003/00; C02F-003/34; C12N-001/21;

C12N-015/53; C12R-001/40; C12N-001/21; C12R-001/19

14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.1

(SANITATION -- Sanitary Equipment); 28.9 (SANITATION --

Other); 32.2 (POLLUTION CONTROL -- Waste Water Treatment)

Section: C, Section No. 1226, Vol. 18, No. 381, Pg. 7, July  
18, 1994 (19940718)

手

15691

4月19日

表示箇所

各頁に続く

## ABSTRACT

Provide a new DNA fragment useful for the preparation of a  
capable of decomposing trichloroethylene.

7号

7号 栗田

7号 栗田

A DNA fragment containing a phenol hydroxylase gene region  
the restriction map shown in the drawing (C230 is a part of  
xxygenase gene; PH is phenol hydroxylase gene). It can be  
eparating a DNA from a chromosomal DNA of e.g. Pseudomonas  
strain (FERM P-13109) and cleaving at the restriction enzyme  
BamI site.

換体およ

## ①広宿主域複製領域を含むDNA断片

## ②薬剤耐性遺伝子（マーカー）

③シュードモナス プチダ KWI-9 菌株染色体DNA由来のフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子

【0016】広宿主域複製領域は、組換プラスミドがグラム陰性細菌内で独立して増殖し、安定して保持されるのに必要な遺伝子領域であり、プラスミドRSF1010由来のもの等を採用することができるが、これに限定されない。RSF1010はグラム陰性細菌内における自律的複製に必要な遺伝子および複製開始部位を含み、約5.8kbのDNA領域に集中して存在する。この領域はRSF1010だけでなく、pKT240、pMMB22等のプラスミドから制限酵素等の核酸分解酵素を用いて分離することができる。

【0017】薬剤耐性遺伝子としては、クロラムフェニコール耐性遺伝子、アンビシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等が採用でき、pACYC184、pKK223-3、pTrc99A、pKT240等のプラスミドから分離できる。シュードモナス プチダ KWI-9 菌株染色体DNA由来のフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子としては、前記本発明のDNA断片が使用できる。

【0018】本発明の組換プラスミドは、種々の異なるプロモーター・ターミネーター系を介してフェノールハイドロキシラーゼを発現させることができる。このため、トリクロロエチレン分解能の向上がプロモーターの改良により容易に行うことができる。また、lacIq等のリプレッサー遺伝子を組込むことにより、イソプロピルチオガラクトシド(IPTG)等の誘導物質により制御が可能となる。従って、フェノール、トルエンの添加は不要である。さらに、リプレッサー遺伝子を欠損させることにより、誘導物質の添加が不要になり、フェノールハイドロキシラーゼを構成酵素として作用させることも可能であり、このため長時間にわたってトリクロロエチレン分解能を維持できる。lacIq遺伝子・プロモーター・オペレーター・ターミネーター系は、pTrc99A等のプラスミドから制限酵素等の核酸分解酵素を用いて分離することができる。

【0019】組換プラスミドの宿主への導入は、エレクトロポーレーション法、カルシウムおよびルビジウム処理による方法、ヘルパープラスミドを用いた伝達による方法等によって、極めて容易に行うことが可能である。宿主としては、組換プラスミドが安定に維持されるグラム陰性細菌が利用されるが、好ましくはシュードモナス属細菌、中でもシュードモナス プチダ KWI-9 菌株およびその変異株等が望ましい。

【0020】また本発明によれば、組換プラスミドを導入した形質転換体を用いてトリクロロエチレンを分解することができる。トリクロロエチレンの分解は、トリクロロエチレンを含む培地中で形質転換体を好気的に培養

する等の方法により行うことができ、完全に脱ハロゲン化できる。

【0021】組換プラスミドを導入した形質転換体の培養は、宿主の生育に適した条件で行われるが、炭素源および窒素源としてペプトン、トリプトン、酵母エキス等、無機塩として塩化ナトリウム、塩化カリウム等を用い、培地のpH5~8.5、好ましくは6~7、温度15~35℃、好ましくは30℃前後で好気的に培養するのが望ましい。

## 10 【0022】

【実施例】次に本発明の実施例について説明する。実施例で使用したプラスミドおよび微生物は次の通りである。

## 1) pKK223-3

タンパク質の発現に用いられる発現ベクター。lacリプレッサーにより調節される強力な tac プロモーターを有し、IPTG等の誘導物質が lac リプレッサーを不活性にすると、転写を誘発する。 tac プロモーターのすぐ下流にはマルチクローニングサイト(MCS)および強力な rrn リポソームターミネーターが存在している。このプラスミドはファルマシア社から市販されており、製品コード番号は27-4935-01である。

## 2) pTrc99A

pKK223-2の誘導体であり、強力な trc プロモーターのすぐ下流には長いマルチクローニングサイトおよび強力なターミネーター(rrnB)が存在している。またpKK223-2にはない lacIq ( lac リプレッサーの強力なもの) 遺伝子を含むため、 lac リプレッサーが欠損する E. coli を宿主として使用することができる。 trc プロモーターは、IPTGの添加により誘発される。なおマルチクローニングサイトの NcoI 制限酵素切断部位には翻訳開始コドン ATG を有しており、このコドンが欠損している遺伝子を挿入しても発現可能である。このプラスミドはファルマシア社から市販されており、製品コード番号は27-5007-01である。

## 3) pACYC184

大腸菌のクローニングベクターで、4244bpの大きさを有する。 E. coli R I サイトの最初のグアニン(G)をヌクレオチド配列の1番目とすると、テトラサイクリン耐性遺伝子を1580~2770番目、クロラムフェニコール耐性遺伝子(Cm)を3804~219番目に有する。

## 4) pKT240

プラスミドRSF1010由来の広宿主域複製領域を有し、多くのグラム陰性細菌内で安定して維持可能な1.9kbのプラスミドである。アンビシリン耐性遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子とを持っている。ATCCから市販されている。ATCC No. 37258 (A)

TCC Catalogue of Recombinant DNA Materials 2nd edition, 1991).

【0026】5) 大腸菌DH5 $\alpha$

大きなプラスミドにより形質転換されやすい。ベセスダ・リサーチ社 (BRL) から市販されている。品番は8262SA。

6) シュードモナス プチダ KWI-9菌株  
フェノール資化能を有し、トルエン資化能を有さないトリクロロエチレン分解性菌株であり、前記微生物受託番号で寄託されている。トリクロロエチレン分解性はフェノールの共存により著しく阻害される。

【0027】実施例1

シュードモナス プチダ KWI-9菌株の生産するフェノールハイドロキシラーゼがトリクロロエチレンを分解していると考え、またC23Oの遺伝子が一つのオペロン中でフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子と共に存在し、かつC23Oの遺伝子の上流にフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子が存在すると考え、C23Oをマーカーにしてフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子の分離を試みた。なお、C23Oはカテコールを2-ヒドロキシムコニックセミアルデヒド (2-Hydroxymuconic semialdehyde) に酸化し、黄変させる。

【0028】大腸菌DH5 $\alpha$ の液体培養にはLB培地を用い、培養温度は37℃に設定した。抗生素質はアンビシリンとクロラムフェニコールをそれぞれ100 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/mlの濃度で使用した。大腸菌DH5 $\alpha$ へのプラスミドの導入は、Hanahanの方法を利用した。サウザンハイブリダイゼーション法、ライゲーション法その他の分子生物学に係わる基本的な手法は、すべて" Molecular cloning" の第2版に従った。

【0029】HindIIIで切断し、5'末端を脱リン酸化処理したpKK223-3に、シュードモナス プチダ KWI-9菌株の染色体を制限酵素HindIIIで切断したDNA断片を組込んだ。このプラスミドを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、形質転換した。この結果、約12000のコロニーが得られ、そのうち9個のコロニーがカテコールのスプレーにより黄変した。これらの形質転換体は、すべて同じ10kbのDNA断片を組んでいた。このDNA断片を含むプラスミドの制限酵素地図を図1に示す。このDNA断片には、2.3kbのEcoR IサイトないしSalIサイトの間にC23O遺伝子が存在した。

【0030】上記10kbのHindIII DNA断片を組込んだpKK223-3を大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、この大腸菌によるフェノールの分解試験を行ったが、フェノールは全く分解されなかった。そこで下記の操作により、さらに上流のDNA断片を取得した。

【0031】シュードモナス プチダ KWI-9菌株の染色体をEcoR Iで切断し、アガロースゲルで電気泳動にかけ、6.0kbのDNA断片を含むアガロースゲル部分を切出した。この中に含まれるDNA断片を第一化学薬品社製のDNAセル (DNA CELL、商標) により取出した。この6.0kbのEcoR I DNA断片をpTrc99AのEcoR Iサイトに組込み、約14000の形質転換体を得た。その中の300をランダムに選び、前記10kbのHindIII DNA断片の0kbのHindIIIサイトないし2.3kbのEcoR Iサイトまでをプローブとして、サウザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、6.0kbのEcoR I DNA断片が組込まれたプラスミドを持つ形質転換体が得られた。このプラスミドの制限酵素地図を図2に示す。このプラスミドには、前記10kbのHindIII DNA断片の0kbのHindIIIサイトが3.7kbの位置に存在した。

【0032】上記二種類のDNA断片 (10kbのHindIII DNA断片、6.0kbのEcoR I DNA断片) を図3に示すように結合させ、下流部位はC23O遺伝子を含むSalIサイトまでの8.5kbのDNA断片をpTrc99Aに組込んだ。なお、図3の制限酵素サイトはpTrc99Aを切断しない制限酵素を利用して決定したものである。

【0033】このプラスミドの上流部位の制限酵素サイトを段階的に削除し、種々の長さのプラスミドを作成し、これらのプラスミドを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、コロニーによるフェノールハイドロキシラーゼおよびC23Oの発現試験を行った。C23Oは0.1Mのカテコールを用い、フェノールハイドロキシラーゼの場合は0.1Mのフェノールを用い、これらをコロニー上に滴下し、これらのコロニーの色の変化を観察した。フェノールハイドロキシラーゼ遺伝子が正しく組込まれている場合は、下流にC23O遺伝子が存在するため、フェノールがフェノールハイドロキシラーゼによりカテコールに酸化された後、続けてC23Oにより黄色の物質が生成されるため、コロニーは黄変する。このため検出は容易である。

【0034】なおStuIサイトから遺伝子を発現させる場合は次のようにして行った。StuIサイトから遺伝子を発現させると、大腸菌に生育障害が起りコロニーが形成されなかったが、これはpTrc99AのNcoIサイトにあるATGより合成されるタンパク質が阻害の原因であることが判明したので、pTrc99Aの代りに、pTrc99AからATG部分を取除いた新しいプラスミドpTrc100を用いて行った。このプラスミドは、pTrc99AをNcoIで切断し、露出したCATGをMung Bean Nucleaseで取除いて作成した。

【0035】発現結果を図4示す。図4から、StuI

サイトないし2番目のSmaI サイトの間にフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子が、2番目のEcoR I サイトないし2番目のSalI サイトの間にC 23 O遺伝子が存在することがわかる。なお、フェノールハイドロキシラーゼ活性が見られたものは、トリクロロエチレン分解活性も見られ、フェノールハイドロキシラーゼがトリクロロエチレンを分解することが明らかとなった。フェノールハイドロキシラーゼ遺伝子とC 23 O遺伝子の存在位置を図5に示す。

【0036】実施例2

フェノールハイドロキシラーゼ遺伝子とC 23 O遺伝子を含むStuI ないし最後のSalI サイトまでのDNA断片(図5参照)を組込んだ組換プラスミドを、シュードモナス プチダ KWI-9菌株に導入し、トリクロロエチレンの分解試験を次のようにして行った。

【0037】シュードモナス プチダ KWI-9菌株の液体培養には下記SOB培地を使用した。寒天培地はSOB寒天培地を用いた。抗生素質はアンピシリンとクロラムフェニコールをそれぞれ100  $\mu$ g/m1、50  $\mu$ g/m1の濃度で使用した。培養温度は30°Cに設定した。シュードモナス プチダ KWI-9菌株へのプラスミドの導入はバイオーラド(BIO-RAD)社製のジーンパルサーを利用し、エレクトロポーレーション法により行った。

【0038】SOB培地:

バクト(Bacto)トリプトン	20g
バクト(Bacto)酵母エキス	5g
NaCl	0.5g
250mM KC1	10m1
蒸留水	全量で990m1とする
pH	7.0

上記溶液をオートクレーブで殺菌し、室温まで冷却した後、これとは別のビンでオートクレーブにより殺菌した2M Mg<sup>2+</sup>液(1M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O + 1M MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O)を10m1加える。

【0039】まず、シュードモナスに多く利用されているRSF1010レブリコンと、pACYC184のクロラムフェニコール耐性遺伝子と、pTrc100の1acIqないしターミネーターまでの部分とを用い、図6に示すIPTGで制御可能なシュードモナス用のプラスミドpRCL100を調製した。

【0040】すなわち、pKT240からPvuIIとPstIで切出される約5.8kbのレブリコン部位(このレブリコンはRSF1010のPvuII(bp1948)~PstI(bp7768)の部分に相当する)と、pACYC184のBstB1(bp3716)~BsaA1(bp310)の部分をT<sub>4</sub>DNAポリメラーゼで処理した後、T<sub>4</sub>DNAリガーゼで連結させ、プラスミドを作成した。次にRSF1010のXmnI(bp2030)サイトを利用し、このプラスミドを切

断し、この部分にT<sub>4</sub>DNAポリメラーゼで処理したpTrc100のBsaA1(bp2769)~BspH1(bp793)(この部分には1acIqが存在する)を組込み、新しいプラスミドpRCL100を作成した。

【0041】次に、フェノールハイドロキシラーゼ遺伝子とC 23 O遺伝子を含むStuI~SalI サイトまでのDNA断片(図5参照)内にBamH I サイトが存在しないので、このDNA断片の両端にBamH I リン

10 カーを結合し、単一酵素ですべてのDNA断片が切出せるように改良した。そして、pRCL100をBamH Iで切断し、その部分にフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子とC 23 O遺伝子を含むDNA断片を組込み、図7に示す新しいプラスミドpNEM101を作成した。このプラスミドは、シュードモナス プチダ KWI-9菌株に導入した場合、安定に維持された。

【0042】このpNEM101をシュードモナス プチダ KWI-9菌株に導入し、次のようにしてトリクロロエチレンの分解試験を行った。組換シュードモナス

20 プチダ KWI-9菌株の前培養液1~2m1を100m1のSOB培地に接種した後、30°Cで培養し、600nmでの吸光度(以下、A<sub>600</sub>という)が0.5~0.7に達した時点で、IPTGを5mM添加した後、2時間培養して誘導した。次に遠心分離により集菌し、菌体を下記無機培地にA<sub>600</sub>が2.0になるように懸濁した。

【0043】無機培地:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1M, pH6.8)	40ml
Huntner's vitamin-free mineral base *1	20ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1g
蒸留水	840ml

\*1 Huntner's vitamin-free mineral base;

ニトリロ三酢酸	10.0 g
MgSO <sub>4</sub>	14.45 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3.335g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	9.25 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	99 mg
メタルズ"44" *2	50 ml
蒸留水	全量で1000mlとする

40 \*2 メタルズ"44"(Metals"44");

エチレンジアミン四酢酸	250.0mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1095.0mg(250mg Zn)
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	500.0mg(100mg Fe)
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	154.0mg(50mg Mn)
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	39.2mg(10mg Cu)
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	24.8mg(5mg Co)
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	17.7mg(2mg B)

数滴の硫酸を加えて沈殿を防止する

蒸留水 100ml

50 【0044】この菌溶液10m1をジーエルサイエンス

(7)

特開平6-105691

11

社製の125ml容のバイアルビンに入れ、トリクロロエチレン10mg/l(すべて液に溶解した場合の濃度)を添加し、テフロンコートブチルゴム栓をした後、アルミニウムキャップでシールした。このバイアルビンを30°C、200rpmで振とう培養し、定期的に気相をガスティシリングで100μlサンプリングし、トリクロロエチレンの分解試験を行った。対照としては、IPTGで誘導しない菌培液を用いた。

【0045】結果を図8に示す。図8から、pRCL100のプロモーターを活性化させるIPTGを添加した場合は、添加しない場合に比べてトリクロロエチレンの分解が著しく、Trcプロモーターの下流に挿入されたフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子が有効に作用し、フェノールハイドロキシラーゼにより活発なトリクロロエチレン分解が行われていることが明らかとなった。

【0046】実施例3

実施例2において、pNEM101の代りに、lacIqを欠損させたプラスミドpNEM201を用い、IPTGを添加しないで、実施例2と同様にしてトリクロロエチレン分解試験を行った。

【0047】pNEM201は次のようにして調製した。まずpKT240からPvuIIとPstIで切出される約5.8kbのレブリコン部位(このレブリコンはRSF1010のPvuII(bp1948)～PstI(bp7768)の部分に相当する)と、pACYC184のBstBI(bp3716)～BsaAI(bp310)の部分をT,DNAポリメラーゼで処理した後、T,DNAリガーゼで連結させ、プラスミドを作成した。次にRSF1010のXbaI(bp2030)サイトを利用し、このプラスミドを切断し、この部分にT,DNAポリメラーゼで処理したpTrc100のPvuII(bp4096)～BspHI(bp793)(この部分にlacIqは存在しない)を組込み、新しいプラスミドpRCT200を作成した。

【0048】次に、フェノールハイドロキシラーゼ遺伝子とC230遺伝子を含むStuI～SalIまでのDNA断片(図5参照)内にBamHIサイトが存在しないので、このDNA断片の両端にBamHIリンカーを結合し、単一酵素ですべてのDNA断片が切出せるように改良した。そして、pRCL200をBamHIで切断し、その部分にフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子とC230遺伝子を含むDNA断片を組込み、図9に示す新しいプラスミドpNEM201を作成した。このプラスミドは、実施例2で使用したpNEM101からlacIqが欠損したものであり、ショードモナスブチダKW1-9菌株に導入した場合、安定に維持された。

12

【0049】こうして得られた形質転換体を用いて実施例2と同様にトリクロロエチレンの分解試験を行った。結果を図10に示す。図10から、誘導物質(IPTG)を添加しなくてもトリクロロエチレンの分解が起こり、その能力は50時間以上の長時間にわたって維持されることがわかる。すなわち、lacIqが存在する場合には実施例2で示したように誘導物質が必要であるが、このlacIqを欠損させると、リプレッサーが生成しないため、誘導物質を添加しなくてもトリクロロエチレンの分解が可能となる。

【0050】

【発明の効果】以上の通り、本発明によれば、トリクロロエチレンを分解するフェノールハイドロキシラーゼの遺伝子を含むDNA断片が得られる。また、上記DNA断片を含み、トリクロロエチレンを分解する形質転換体を調製する際にベクターとして利用でき、しかもトリクロロエチレンの分解活性の高い新規な組換プラスミドが得られる。

【0051】さらに、上記組換プラスミドを保持し、ト

リクロロエチレンの分解に利用できる形質転換体が得られる。さらにまた、上記形質転換体を利用することにより、トリクロロエチレンを簡単に効率よく分解できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で作成したプラスミドの制限酵素地図である。

【図2】実施例1で作成したプラスミドの制限酵素地図である。

【図3】本発明のDNA断片を含むプラスミドの制限酵素地図である。

【図4】実施例1の試験結果を示す図である。

【図5】本発明のDNA断片を含むDNA断片の制限酵素地図である。

【図6】実施例2で作成したプラスミドの制限酵素地図である。

【図7】実施例2で作成したプラスミドの制限酵素地図である。

【図8】実施例2の試験結果を示すグラフである。

【図9】実施例3で作成したプラスミドの制限酵素地図である。

【図10】実施例3の試験結果を示すグラフである。

【符号の説明】

P プロモーター

PH フェノールハイドロキシラーゼ遺伝子

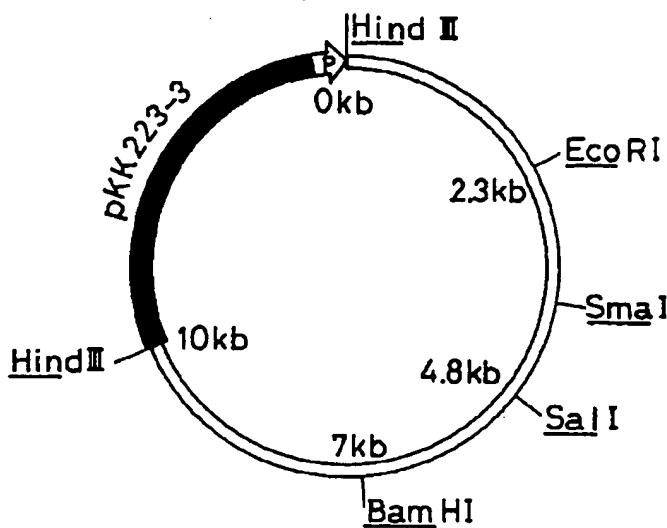
C230 カテコール2,3オキシゲナーゼ遺伝子

Cm クロラムフェニコール耐性遺伝子

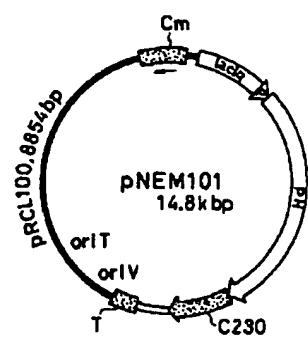
5ST1T2, T ターミネーター

IPTG イソプロピルチオガラクトン

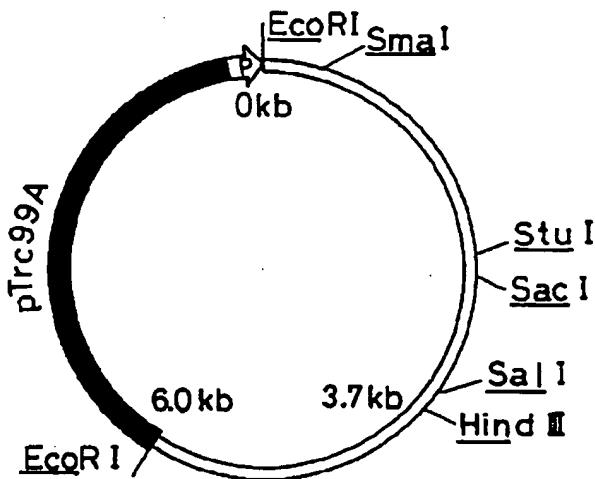
【図1】



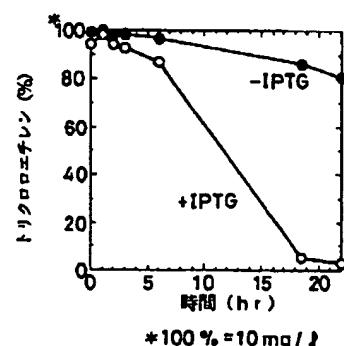
【図7】



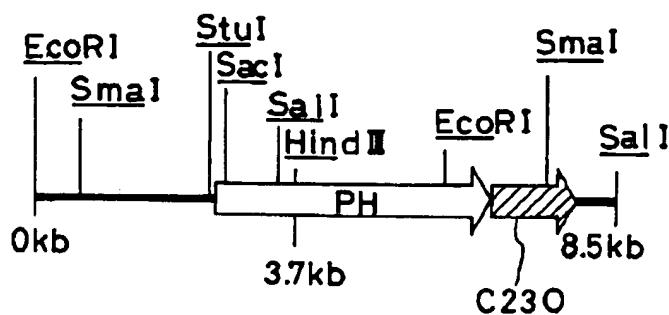
【図2】



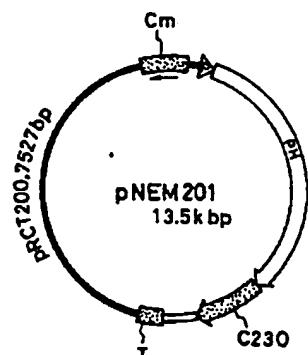
【図8】



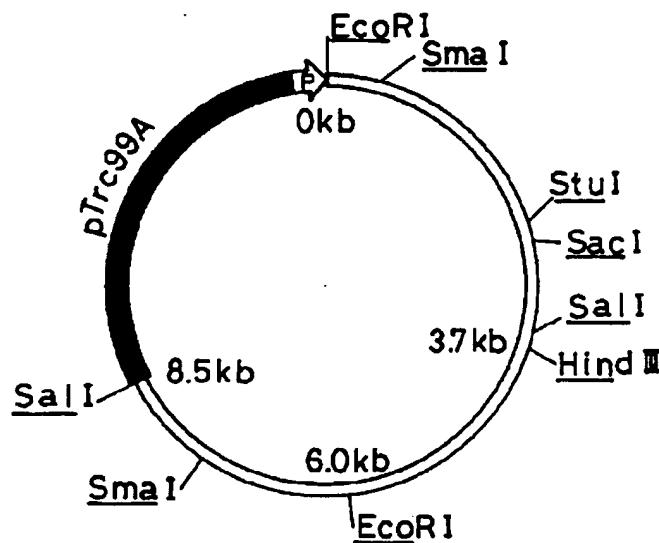
【図5】



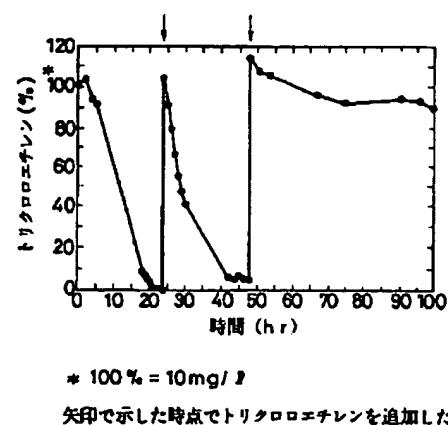
【図9】



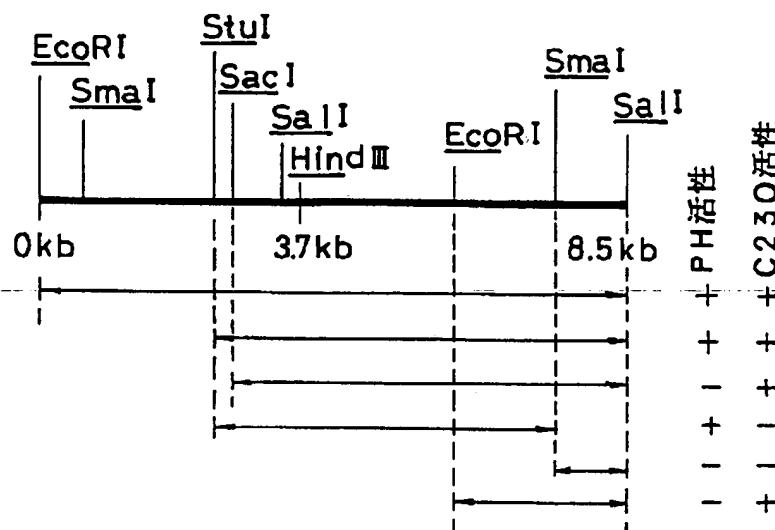
【図3】



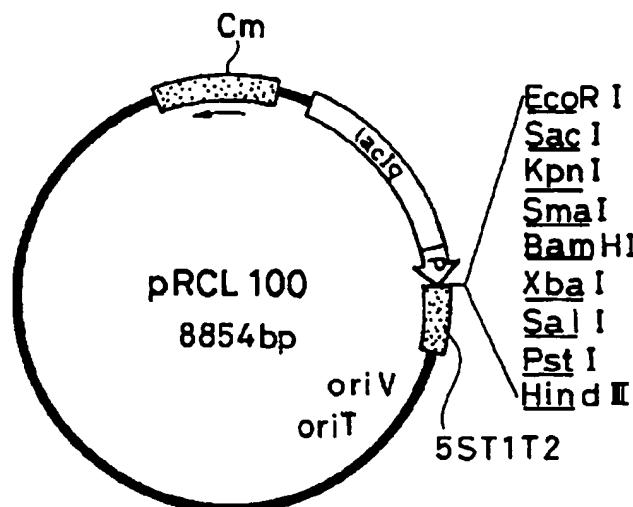
【図10】



【図4】



【図6】



## 【手続補正書】

【提出日】平成5年8月11日

## 【手続補正】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0048】次に、フェノールハイドロキシラーゼ遺伝子とC23O遺伝子を含むS<sub>ta</sub>uI～S<sub>al</sub>IまでのDNA断片（図5参照）内にB<sub>am</sub>HIサイトが存在しないので、このDNA断片の両端にB<sub>am</sub>HIリンカーを

結合し、単一酵素ですべてのDNA断片が切出せるよう  
に改良した。そして、p<sub>R</sub>CT200をB<sub>am</sub>HIで切  
断し、その部分にフェノールハイドロキシラーゼ遺伝子  
とC23O遺伝子を含むDNA断片を組込み、図9に示  
す新しいプラスミドpNEM201を作成した。このブ  
ラスミドは、実施例2で使用したpNEM101からI  
acIqが欠損したものであり、シードモナス ブチ  
ダ KW1-9菌株に導入した場合、安定に維持され  
た。

## フロントページの続き

-(51) Int.Cl. <sup>5</sup> -	識別記号	府内整理番号	F-1	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
//(C 1 2 N 15/53				
C 1 2 R 1:40)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				